

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑳ Aktenzeichen: P 36 04 815.1
㉔ Anmeldetag: 15. 2. 86
㉕ Offenlegungstag: 20. 8. 87

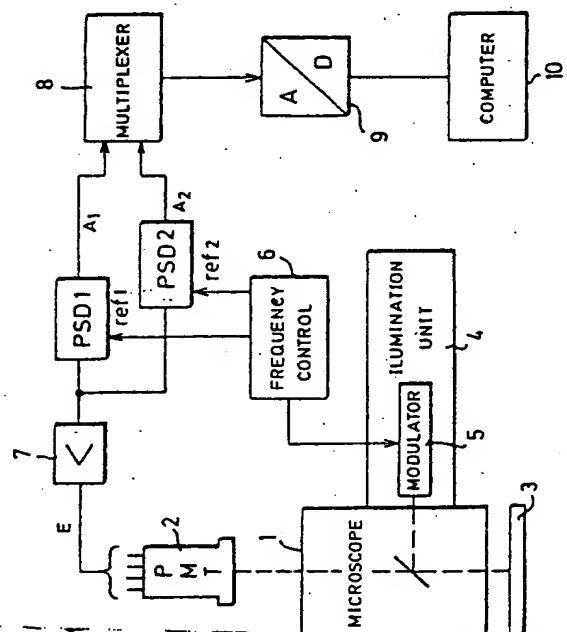
㉚ Anmelder:
Fa. Carl Zeiss, 7920 Heidenheim, DE

㉛ Erfinder:
Baur Schmidt, Peter, Dr., 7080 Aalen, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉜ Mikroskopphotometer

Das Photometer besitzt ein anstelle der Leuchte (Lampengehäuse) am Mikroskop anbringbaren Beleuchtungsblock (4), der zwei auswechselbare Filter und einen beide durch die Filter hindurchtretende Teilstrahlen gleichzeitig, aber mit unterschiedlicher Frequenz modulierenden Chopper (5) enthält. Im Nachweiskanal sind zwei auf die beiden Frequenzen des Choppers (5) abgestimmte Schmalbandverstärker PSD1 und PSD2 in Parallelschaltung angeordnet.



1. Mikroskopphotometer zur Messung der Fluoreszenz oder Absorption einer Probe bei zwei verschiedenen Wellenlängen, dadurch gekennzeichnet, daß

- ein anstelle der Leuchte (Lampengehäuse) am Mikroskop anbringbarer Beleuchtungsblock (4, 104) vorgesehen ist,
- der Beleuchtungsblock mindestens zwei Filter (17, 18; 117, 118) sowie eine das durch die beiden Filter hindurchtretende Licht gleichzeitig mit unterschiedlicher Frequenz modulierende Einheit (5, 105) enthält,
- und im Nachweiskanal hinter dem zur Intensitätsmessung des von der Probe ausgehenden Lichts verwendeten Empfänger (Photomultiplier 2) zwei, auf die Frequenzen der Modulationseinheit (5, 105) abgestimmte Schmalbandverstärker (PSD1, PSD2) in Parallelschaltung angeordnet sind.

2. Mikroskopphotometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Filter (17, 18; 117, 118) auswechselbar sind.

3. Mikroskopphotometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Modulationseinheit (5) ein mehrere Spuren (23, 24) unterschiedlicher Teilung aufweisendes Zerkhackerrad (19) ist.

4. Mikroskopphotometer nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Beleuchtungsblock zwei Abbildungsstrahlengänge enthält, die das Licht in die Ebene des Zerkhackerrades fokussieren.

5. Mikroskopphotometer nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Bündeldurchmesser der beiden Strahlengänge in der Ebene des Zerkhackerrades unterschiedlich ist.

6. Mikroskopphotometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Modulationseinheit (105) aus zwei separat ansteuerbaren Lichtverschlüssen (119, 120) besteht.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Mikroskopphotometer zur Messung der Fluoreszenz oder Absorption einer Probe bei zwei verschiedenen Wellenlängen.

Für zellbiologische Untersuchungen werden zur Markierung der Proben zunehmend fluorochrome Substanzen eingesetzt, die eine Messung ganz spezieller Zell- bzw. Probeigenschaften erlauben. Die Wirkungsweise der Markierungen beruht darauf, daß Änderungen im spektralen Verhalten der fluorochromen Substanz unter dem Einfluß von chemisch/biologischen Reaktionen auftreten, wie das in Fig. 4 schematisch dargestellt ist.

Beispielsweise ändert die Markiersubstanz FURA-2 ihr Fluoreszenzverhalten in der in Fig. 5 skizzierten Form, wenn sie Änderungen in der Konzentration freier Ca-Ionen in der zu untersuchenden Zellprobe, ausgesetzt sind. Durch fluorometrische Messungen bei zwei Anregungswellenlängen unter einem Mikroskopphotometer läßt sich deshalb die Konzentration von freien Kalziumionen in Zellen bestimmen.

Gegenüber früher verwendeten Markierungen, die nur im absoluten Intensitätsmaß und nicht im spektralen Verhalten variieren, besitzt die neue Markierung die Vorteile einer Relativmessung. Es werden deshalb Ge-

räteeigenschaften und Instabilitäten z. B. der Beleuchtung eliminiert (Quotientenverfahren).

In der Zeitschrift "Cell Calcium" 6 (1985) Seite 145–157 ist von Tsien et al. ein Mikroskopphotometer beschrieben, das zur Anregung der Probe bei zwei verschiedenen Wellenlängen zwei Lichtquellen und zwei der Lichtquelle nachgeschalteten durchstimbare Monochromatoren besitzt. Das Licht beider Monochromatoren wird über einen Zerkhackerrad sequentiell in den Beleuchtungsstrahlengang des Mikroskops eingekoppelt. Diese bekannte Anordnung ist sehr aufwendig und teuer und läßt sich nicht ohne weiteres nachträglich an bereits vorhandene Mikroskope bzw. Mikroskopphotometer anbauen.

Es ist auch vorgeschlagen worden, anstelle der Monochromatoren und des Zerkhackerrads ein rotierendes Paar von Interferenzfiltern einzusetzen. Eine derartige Beleuchtungsanordnung ist z. B. in der US-PS 34 97 690 für einen anderen Zweck beschrieben. Beide Lösungen haben aber grundsätzlich den Nachteil, daß die zu den zwei unterschiedlichen Wellenlängen gehörenden Signale vom Detektor des Photometers nacheinander erfaßt werden. Diese Art des Nachweises stellt ein reines Umschaltverfahren dar, bei dem die Signalfrequenz weitgehend erhalten bleiben muß und das deshalb eine hohe Verstärkungsbandbreite erfordert. Eine hohe Verstärkungsbandbreite macht jedoch das Meßsystem empfindlich gegenüber Störungen von Umgebungslicht und Rauschen des Detektors und der Verstärker. Die Nachweismengen dieses Verfahrens sind deshalb beschränkt.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Mikroskopphotometer zu schaffen, das eine besonders empfindliche Messung bei zwei verschiedenen Wellenlängen gestattet, wobei die dafür nötige Beleuchtungseinrichtung leicht und ohne großen Aufwand nachträglich an ein bereits vorhandenes Mikroskop adaptiert werden kann.

Diese Aufgabe wird gemäß dem Kennzeichen des Hauptanspruches dadurch gelöst, daß ein anstelle der Leuchte (Lampengehäuse) am Mikroskop anbringbarer Beleuchtungsblock (4, 104) vorgesehen ist, der Beleuchtungsblock mindestens zwei Filter (17, 18; 117, 118) sowie eine das durch die beiden Filter hindurchtretende Licht gleichzeitig mit unterschiedlicher Frequenz modulierende Einheit (5, 105) enthält, und im Nachweiskanal hinter dem zur Intensitätsmessung des von der Probe ausgehenden Lichts verwendeten Empfänger (Photomultiplier 2) zwei, auf die Frequenzen der Modulationseinheit (5) abgestimmte Schmalbandverstärker (PSD1, PSD2) in Parallelschaltung angeordnet sind.

Durch diese Maßnahme werden vom Detektor des Photometers die der Anregung bei unterschiedlicher Wellenlänge entsprechenden Signale gleichzeitig erfaßt und parallel ausgewertet. Aufgrund der schmalbandigen Signalverarbeitung in den beiden parallelen Zweigen der Nachweiselektronik ergibt sich ein hohes Signal/Rauschverhältnis, so daß die Nachweismenge stark verbessert ist.

Die Beleuchtungseinrichtung läßt sich zudem als modulare Baugruppe leicht anstelle des sonst üblichen Lampengehäuses am Mikroskopphotometer anbringen. Es ist vorteilhaft, ein Zerkhackerrad mit mehreren Spuren unterschiedlicher Teilung oder separat ansteuerbare Lichtverschlüsse zur gleichzeitigen Modulation des Lichts beider Wellenlängen mit zwei verschiedenen Frequenzen vorzusehen.

Die für die Trennung des Lichts in verschiedene Wellenlängen verwendeten Filter, wie z. B. Interferenzfilter,

sind zweckmäßig auswechselbar im Beleuchtungsblock angeordnet, damit die Anregungswellenlängen an das spektrale Verhalten unterschiedlicher Markiersubstanzen angepaßt werden können.

Weitere Vorteile der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus der nachstehenden Beschreibung von Ausführungsbeispielen anhand der Fig. 1 – 7 der Zeichnung.

Fig. 1a ist eine schematische Schnittzeichnung eines ersten Ausführungsbeispiels für den Beleuchtungsblock des erfindungsgemäßen Photometers;

Fig. 1b ist eine vergrößerte Detailzeichnung des Zerkhackerrades (19) aus Fig. 1;

Fig. 2 ist eine schematische Schnittzeichnung eines zweiten Ausführungsbeispiels für den Beleuchtungsblock des Photometers;

Fig. 3 ist eine schematische Schnittzeichnung eines dritten Ausführungsbeispiels für den Beleuchtungsblock des Photometers;

Fig. 4 ist eine Prinzipskizze, die den spektralen Verlauf der Extinktion einer Markiersubstanz unter dem Einfluß von chemisch-biologischen Reaktionen zeigt;

Fig. 5 stellt das Anregungsspektrum der fluorochemischen Markiersubstanz FURA-2 für zwei verschiedene Ca^{2+} -Konzentrationen dar;

Fig. 6 ist eine Prinzipskizze des gesamten Photometeraufbaus einschließlich des Nachweiskanal;

Fig. 7 ist ein Diagramm des zeitlichen Signalverlaufs am Ausgang des Detektors (2) aus Fig. 6.

Das in Fig. 6 in seinem Gesamtaufbau skizzierte Photometer besteht aus einem Mikroskop (1) herkömmlicher Bauart, das einen Photomultiplier (2) als Detektor für den Nachweis der von der Probe (3) ausgehenden z. B. Fluoreszenzstrahlung besitzt. Zur Anregung der Probe (3) mit Licht zweier verschiedener Wellenlängen dient ein Beleuchtungsblock (4), der eine Modulationseinheit (5) enthält. Der Beleuchtungsblock (4) wird noch im Zusammenhang mit den Fig. 1 – 3 näher beschrieben.

Der Modulator (5) wird von einem Steuergerät (6) angesteuert und moduliert die Intensität der beiden Teilbündel des Beleuchtungslichtes mit zwei unterschiedlichen Frequenzen f_1 und f_2 . Beide Frequenzen werden außerdem über die mit ref_1 und ref_2 bezeichneten Leitungen als Referenzfrequenz zwei parallel geschalteten Schmalbandverstärkern PSD1 und PSD2 zugeführt, deren Eingänge mit dem Ausgang eines dem Photomultiplier (2) nachgeschalteten Vorverstärkers (7) verbunden sind.

Die Schmalbandverstärker PSD1 und PSD2 enthalten phasenempfindliche Gleichrichter, die auf der jeweiligen Referenzfrequenz ref_1 und ref_2 arbeiten (lock-in-Technik). Dabei entstehen aus dem vom Photomultiplier (2) gelieferte Signal E , dessen zeitlichen Verlauf Fig. 7 zeigt, zwei Einzelsignale A_1 und A_2 an den Ausgängen der Schmalbandverstärker PSD1 und PSD2, die der Intensität der Fluoreszenzstrahlung der Probe (3) bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen entsprechen. Die Signale A_1 und A_2 werden von einem Multiplexer (8) abgefragt und nach Wandlung im Analog/Digitalwandler (9) einem Computer (10) zur Berechnung z. B. der Konzentration der in der Probe (3) enthaltenen Ca^{2+} -Ionen zugeführt. Eine Synchronisierung zwischen der Steuereinheit (6) des Modulators (5) und der Arbeitsfrequenz des Multiplexers (8) bzw. des Rechners (10) ist bei dieser Anordnung nicht erforderlich.

In Fig. 1a ist der verwendete Beleuchtungsblock (4) detaillierter dargestellt. Er besteht aus einem geschlossenen Gehäuse (26), das anstelle der sonst dort befestig-

ten Mikroskopleuchte mit Hilfe der üblichen Aufnahmeschwalbe (11) an dem Stativ (25) des Mikroskopphotometers befestigt ist. Im Innern des Gehäuses (26) befindet sich eine Hochleistungslichtquelle (12) wie z. B. eine Quecksilberhochdrucklampe mit zwei einander diametral gegenüberstehenden Lampenkollektoren (13 und 14). Die beiden von der Lampe (12) ausgehenden Lichtbündel werden von Umlenkspiegeln (15 und 16) je einem Anregungsfilter (17 und 18) mit unterschiedlicher spektraler Transmission zugeführt. Bei den Filtern (17 und 18) handelt es sich z. B. um Interferenzfilter, deren Durchlaßbereich in der Nähe der beiden in Fig. 5 mit λ_1 und λ_2 bezeichneten Wellenlängen bei etwa 340nm und 380nm liegt.

Die beiden durch die Filter (17 und 18) hindurchtretenden Teilstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge werden von einem Zerkhackerrad (19), das von einem Motor (20) angetrieben wird, periodisch aber mit unterschiedlicher Frequenz moduliert.

Fig. 1b zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Zerkhackerrades. Darauf sind die beiden Spuren (23 und 24) mit unterschiedlicher Teilung deutlich zu erkennen. Nach Modulation durch das Zerkhackerrad (19) werden beide Teilstrahlen über einen Strahlteiler (21) gemeinsam in den Beleuchtungsstrahlengang des Mikroskopphotometers eingespiegelt.

Bei rechteckförmiger Modulation des Anregungslichtes entstehen Oberwellensignale, die den Nachweis der Signale auf den Grundfrequenzen f_1 und f_2 durch die Schmalbandverstärker PSD1 und PSD2 stören können. Es ist möglich diese Störungen zu verringern, indem man das Verhältnis der Teilungen beider Spuren (23 und 29) des Zerkhackerrades und damit das Verhältnis der Frequenzen f_1 und f_2 ungeradzahlig wählt. Durch diese Maßnahme wird verhindert, daß Oberwellen z. B. der Frequenz f_1 den Nachweis auf der Frequenz f_2 beeinflussen. Geht man außerdem dazu über, die Intensität des Anregungslichts zumindest annähernd sinusförmig zu modulieren, werden Oberwellen von vornherein unterdrückt. Eine sinusförmige Modulation erreicht man durch geeignete Anpassung des Bündelquerschnitts des Beleuchtungsstrahlenganges in der Ebene des Zerkhackerrades an die Abmessungen der Öffnungen des Zerkhackerrades.

Dazu enthält der Beleuchtungsblock im Ausführungsbeispiel nach Fig. 2 zwei Kollektoren (33 und 34) unterschiedlicher Brennweite, die das Licht der Lampe (32) jeweils so in die Ebene des Zerkhackerrades (29) fokussieren, daß zwei kreisförmige Felder unterschiedlichen Durchmessers entsprechend der Größe der Öffnungen auf beiden Spuren des Zerkhackerrades entstehen. Die beiden Linsen (35 und 36) in Lichtrichtung hinter dem Zerkhackerrad (29) dienen dazu, die beiden unterschiedlichen Teilstrahlengänge im Beleuchtungsblock wieder einander anzupassen. Die übrigen Bauteile entsprechen denen im Ausführungsbeispiel nach Fig. 1, so daß auf eine Wiederholung an dieser Stelle verzichtet werden kann.

In Fig. 3 ist ein alternatives Ausführungsbeispiel für den Beleuchtungsblock aus Fig. 1/2 dargestellt. Der Beleuchtungsblock (104) in Fig. 3 enthält in seinem Gehäuse (124) anstelle des von einem Motor angetriebenen Zerkhackerrades eine Modulationseinheit (105) gebildet aus zwei einzeln ansteuerbaren, elektro-optischen Lichtverschlüssen (119 und 120). Die Lichtverschlüsse modulieren die beiden durch die Filter (117 und 118) hindurchtretenden Teilstrahlen unabhängig voneinander. Um eine möglichst hohe Modulationsfrequenz err-

reichen zu können sind z. B. Kerrzellen für die Lichtverschlüsse verwendet.

Diese Lösung mit zwei Lichtverschlüssen bietet den Vorteil, daß die Öffnungszeiten bzw. die Modulationsfrequenzen frei wählbar und für beide Beleuchtungsstrahlengänge unabhängig voneinander einstellbar sind. Sie können dann im Hinblick auf das Signal/Rauschverhältnis im Nachweiskanal optimiert werden.

10

15

20

25

30

35

40

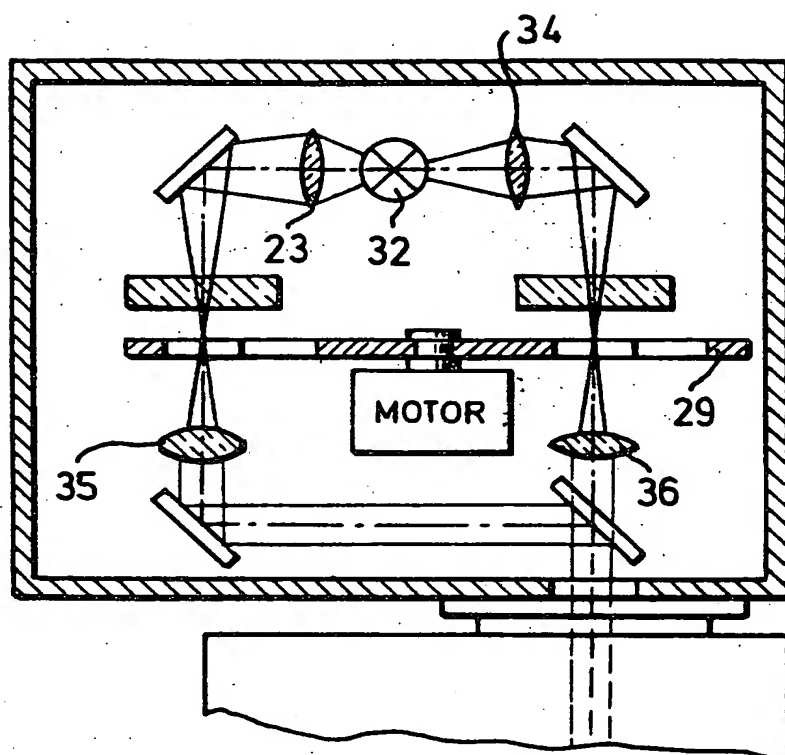
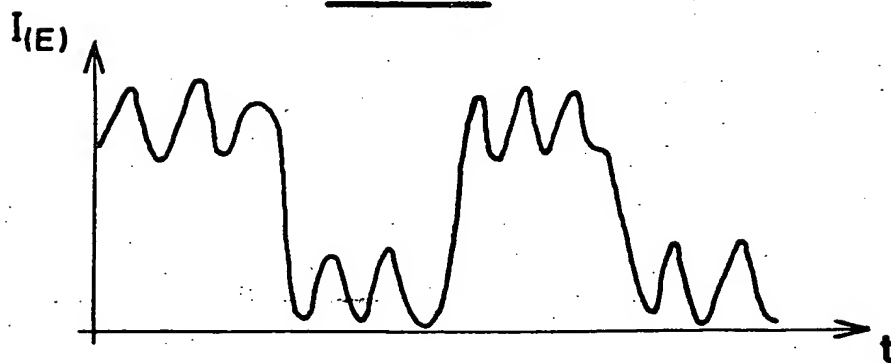
45

50

55

60

65

Fig.2Fig.7

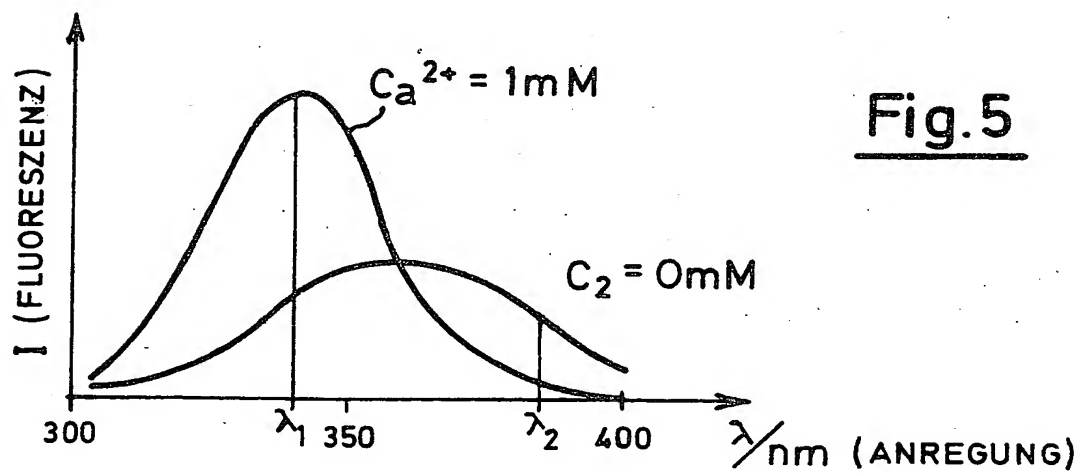
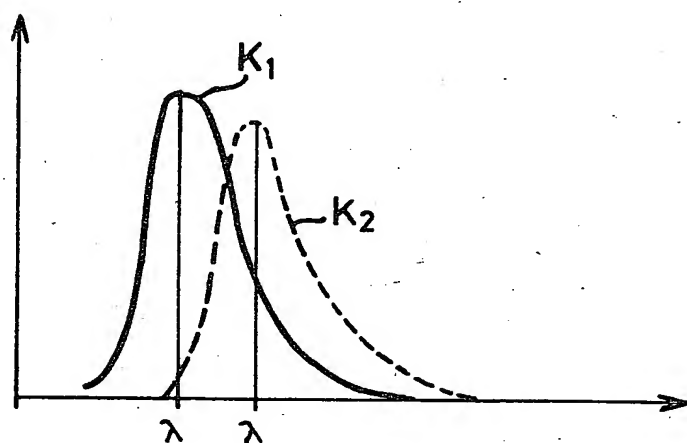
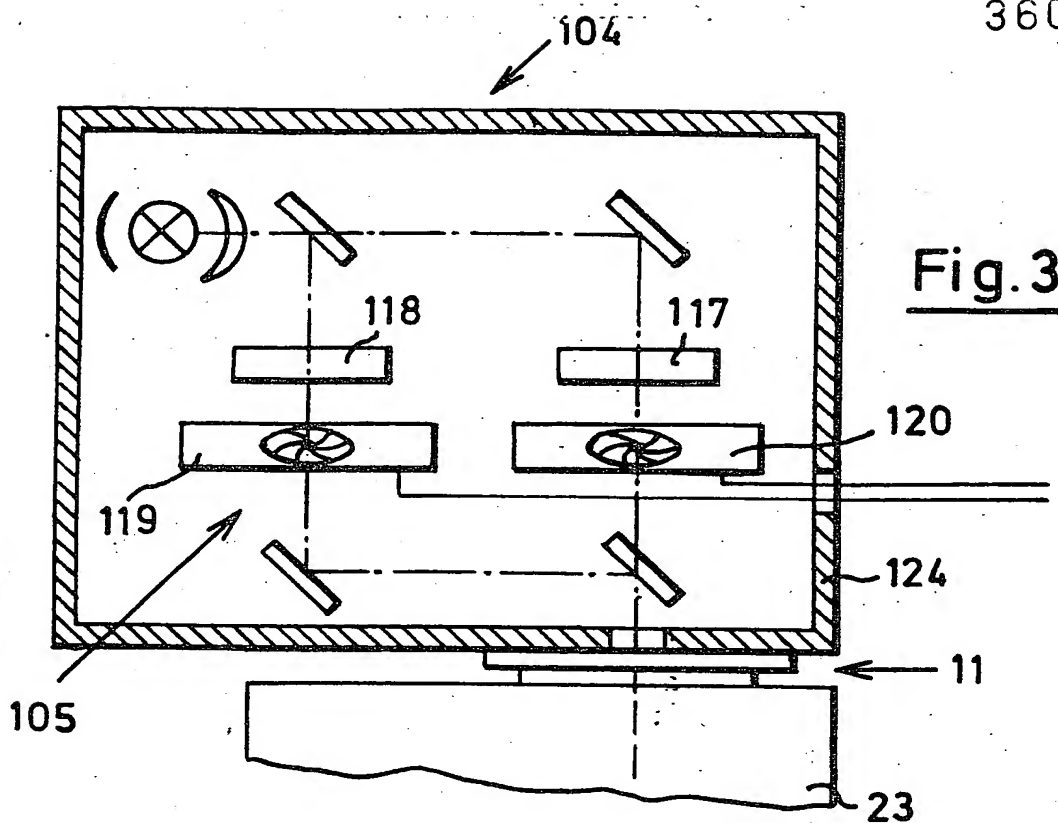
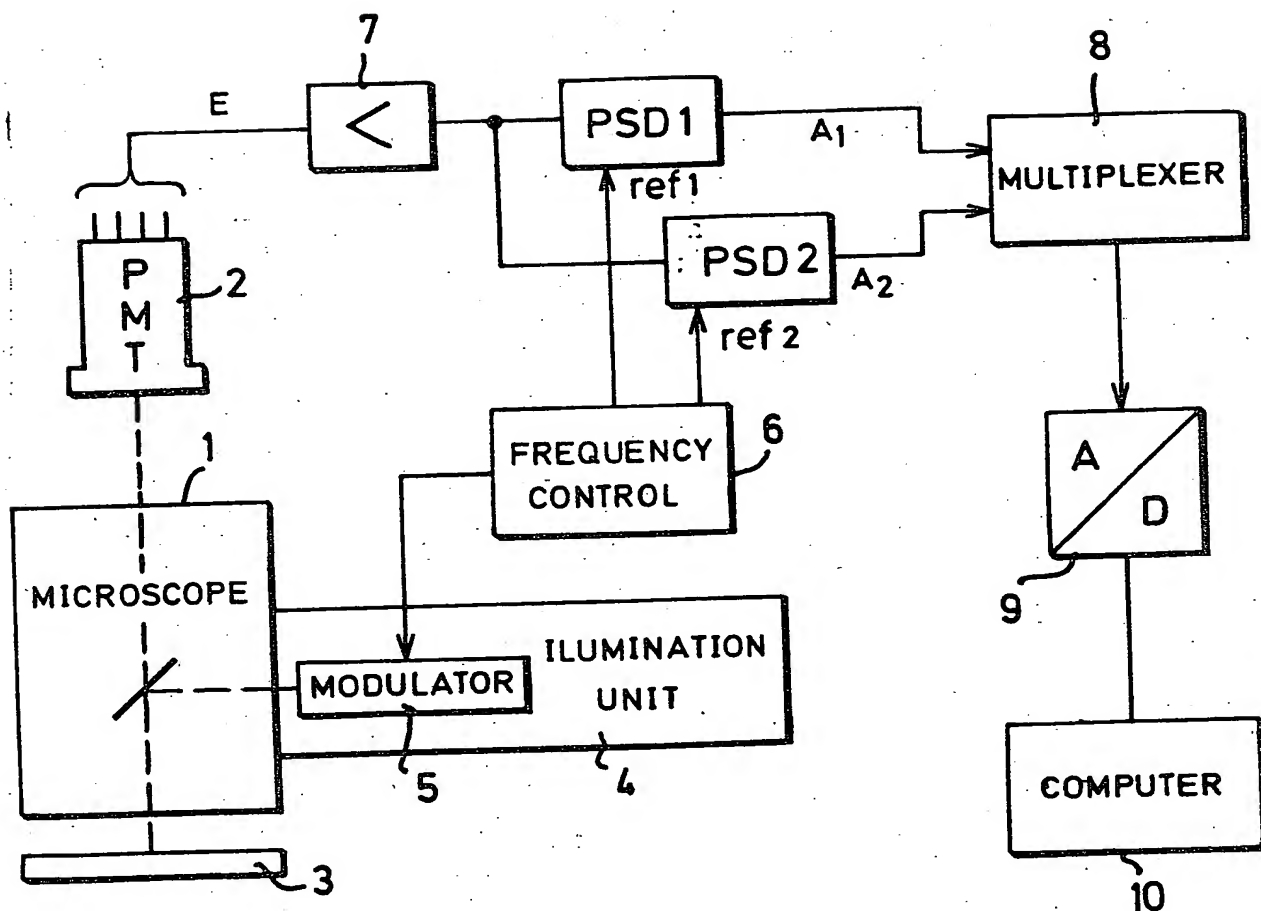


Fig.6

Nummer:
 Int. Cl.4:
 Anmeldetag:
 Offenlegungstag:

36 04 815
 G 01 N 21/64
 15. Februar 1986
 20. August 1987

3604815

Fig.1a

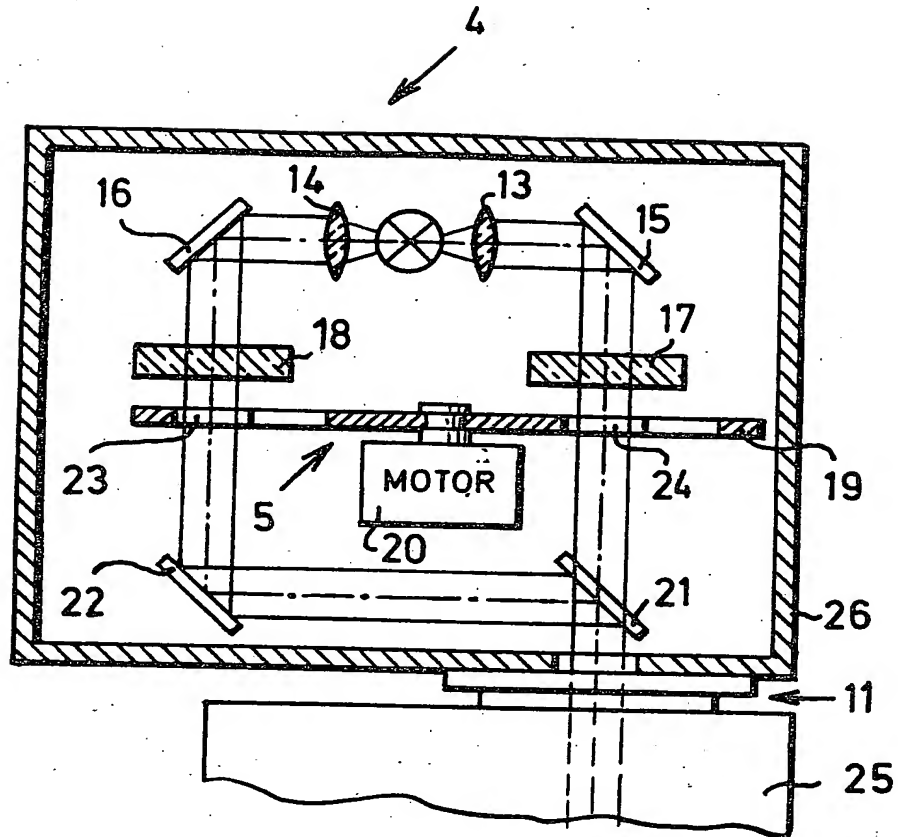
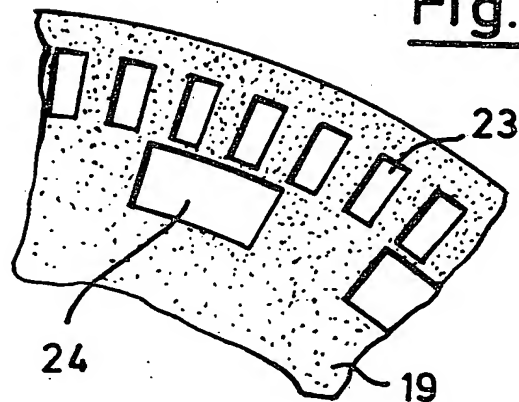


Fig.1b



TRANSLATION

from:

DE 36 04 815 A1

Claims:

1. A microscope photometer for measuring the fluorescence or absorption of a specimen at two different wavelengths, characterized by the fact that

- an illumination block (4, 104) which can be attached to the microscope is provided in place of the illuminator (lamp housing),

- the illumination block contains at least two filters (17, 18; 117, 118) as well as a unit (5, 105) which simultaneously modulates with different frequency the light passing through the two filters, and

- two narrow-band amplifiers (PSD1, PSD2) which are adapted to the frequencies of the modulation unit (5, 105) are arranged connected in parallel in the detection channel behind the receiver (photomultiplier 2) used for the measurement of the intensity of the light coming from the specimen.

2. A microscope photometer according to Claim 1, characterized by the fact that the filters (17, 18; 117, 118) are replaceable.

3. A microscope photometer according to Claim 1, characterized by the fact that the modulation unit (5) is a chopping wheel (19) having multiple tracks (23, 24) of different division.

4. A microscope photometer according to Claim 3, characterized by the fact that the illumination block

TRANSLATION

-2-

contains two imaging ray paths which focus the light into the plane of the chopping wheel.

5. A microscope photometer according to Claim 4, characterized by the fact that the ray bundle diameter of the two ray paths in the plane of the chopping wheel is different.

6. A microscope photometer according to Claim 1, characterized by the fact that the modulation unit (105) consists of two separately controllable light shutters (119, 120).

TRANSLATION

-3-

Specification:

Microscope Photometer

The present invention relates to a microscope photometer for measuring the fluorescence or absorption of a specimen at two different wavelengths.

For cell biology studies, fluorochromic substances which permit a measurement of very specific cell or specimen properties are being used more and more for the labeling of the specimens. The manner of action of the labelings is based on the fact that changes in the spectral behavior of the fluorochromic substance take place under the influence of chemical/biological reactions, as is shown diagrammatically in Fig. 4.

For example, the labeling substance FURA-2 changes its fluorescence behavior in the manner sketched in Fig. 5 when it is subjected to changes in the concentration of free Ca ions in the cell specimen to be examined. Therefore, the concentration of free calcium ions in cells can be determined by fluorometric measurements at two excitation wavelengths under a microscope photometer.

As compared with the labelings previously used, which vary only in absolute intensity and not in spectral behavior, the new labeling has the advantages of a relative measurement. Therefore, instrument properties and instabilities, for instance, of the illumination are eliminated (quotient method).

TRANSLATION

-4-

In the journal "Cell Calcium" 6 (1985), pages 145 to 157, Tsien et al. describe a microscope photometer which, for the excitation of the specimen at two different wavelengths, has two sources of light and two tunable monochromators which are connected behind the source of light. The light of the two monochromators is coupled sequentially via a chopper into the illumination ray path of the microscope. This known arrangement is very cumbersome and expensive and cannot be readily attached subsequently to microscopes or microscope photometers which are already in existence.

It has also been proposed to use a rotating pair of interference filters instead of the monochromators and the chopping wheel. One such illuminating arrangement is described, for instance, for a different purpose in US Patent 34 976 90. Both solutions, however, have in principle the disadvantage that the signals corresponding to the two different wavelengths are detected one after the other by the detector of the photometer. This type of detection represents a pure switching method in which the form of the signal must be substantially retained and which therefore requires a high amplification bandwidth. A high amplification bandwidth, however, makes the measurement system sensitive to disturbances by ambient light and noise of the detector and the amplifiers. The limits of detection of this method are therefore restricted.

The object of the present invention is to provide a

TRANSLATION

-5-

microscope photometer which permits a particularly sensitive measurement at two different wavelengths, the illuminating device required for this being capable of being adapted easily and without great expense to an already existing microscope.

This object is achieved in accordance with the body of the Main Claim in the manner that an illuminating block (4, 104) which can be attached to the microscope is provided instead of the light (lamp housing), the illuminating block containing at least two filters (17, 18; 117, 118) as well as a unit (5, 105) which simultaneously modulates with different frequency the light passing through the two filters,

and two narrow-band amplifiers (PSD 1, PSD 2) tuned to the frequencies of the modulation unit (5) are arranged, connected in parallel, in the detection channel behind the receiver (photomultiplier 2) used for the measurement of the intensity of the light coming from the specimen.

By this measure, the signals corresponding to the excitation at different wavelength are detected simultaneously by the detector of the photometer and evaluated in parallel. As a result of the narrow-band signal processing in the two parallel branches of the electronic detection system there is a high signal/noise ratio, so that the sensitivity of detection is greatly improved.

The illuminating device can furthermore be easily attached as a modular component to the microscope photometer

TRANSLATION

-6-

in the place of the lamp housing otherwise customary. It is advantageous to provide a chopping wheel with a plurality of tracks of different division or separately controllable light shutters for the simultaneous modulation of the light of both wavelengths with two different frequencies.

The filters used for the separation of the light into different wavelengths, such as, for instance, interference filters, are advisedly arranged replaceably within the illumination block so that the excitation wavelengths can be adapted to the spectral behavior of different labeling substances.

Other advantages of the present invention will become evident from the following description of embodiments, given with reference to Figs. 1 to 7 of the drawing, in which:

Fig. 1a is a diagrammatic sectional drawing of a first embodiment for the illumination block of the photometer of the invention;

Fig. 1b is a detail view on a larger scale of the chopping wheel (19) of Fig. 1;

Fig. 2 is a diagrammatic sectional drawing through a second embodiment of the illumination block of the photometer;

Fig. 3 is a diagrammatic sectional drawing through a third embodiment of the illumination block of the photometer;

Fig. 4 is a basic diagram which shows the spectral

TRANSLATION

-7-

variation of the extinction of a labeling substance under the influence of chemical-biological reactions;

Fig. 5 shows the excitation spectrum of the fluorochrome labeling substance FURA-2 for two different Ca^{2+} concentrations;

Fig. 6 is a basic diagram of the entire construction of the photometer including the detection channel;

Fig. 7 is a diagram of the variation of the signal with time at the output of the detector (2) of Fig. 6.

The photometer, which is sketched in its entire construction in Fig. 6, consists of a microscope (1) of traditional construction which has a photomultiplier (2) as detector for the detection of the fluorescence radiation, for instance, emerging from the specimen (3). For the exciting of the specimen (3) with light of two different wavelengths there is used an illumination unit (4) which contains a modulator (5). The illumination block (4) will be described further below in connection with Figs. 1 to 3.

The modulator 5 is controlled by a control unit (6) and modulates the intensity of the two partial beams of the illuminating light by two different frequencies f_1 and f_2 . The two frequencies are furthermore fed, via the lines designated ref_1 and ref_2 , as reference frequency to two narrow-band amplifiers PSD1 and PSD2 connected in parallel

TRANSLATION

from:

-8-

the inputs of which are connected to the output of a preamplifier (7) arranged behind the photomultiplier (2).

The narrow-band amplifiers PSD1 and PSD2 contain phase-sensitive rectifiers which operate on the corresponding reference frequencies ref1 and ref 2 (lock-in technique). In this way there is produced from the signal E, which is supplied by the photomultiplier (2) and the variation of which with time is shown in Fig. 7, two individual signals A1 and A2 at the outputs of the narrow-band amplifiers PSD1 and PSD2, which signals correspond to the intensity of the fluorescence radiation of the specimen (3) at two different excitation wavelengths. The signals A1 and A2 are picked up by a multiplexer (8) and, after conversion in the analog-digital converter (9), fed to a computer (10) for the computing, for instance, of the concentration of the Ca^{2+} -ions contained in the specimen (3). A synchronization between the control unit (6) of the modulator (5) and the operating frequency of the multiplexer (8) or computer (10) is not necessary in the case of this arrangement.

The illumination block (4) used is shown in further detail in Fig. 1a. It consists of a closed housing (26) which is fastened to the stand (25) of the microscope photometer by means of the ordinary receiving dovetail (11) in the place of the microscope light otherwise attached there. Within the housing (26) there is a high-output light source (12) such as, for instance, a high-pressure mercury

TRANSLATION

-9-

lamp having two lamp collectors (13 and 14) arranged diametrically opposite each other. The two bundles of light coming from the lamp (12) are fed by deflection mirrors (15 and 16) to separate excitation filters (17 and 18) of different spectral transmission. The filters (17 and 18) are, for instance, interference filters whose pass region lies in the vicinity of the two wavelengths designated 1 and 2 in Fig. 5, at about 340 nm and 380 nm.

The two partial beams of different wavelength which pass through the filters (17 and 18) are modulated periodically but with different frequency by a chopping wheel (19) which is driven by a motor (20).

Fig. 1b shows a portion of the chopping wheel on larger scale. The two tracks (23 and 24) of different pitch can clearly be noted therein. After modulation by the chopping wheel (19), the two individual beams are reflected via a beam splitter (21) jointly into the illumination ray path of the microscope photometer.

Upon rectangular modulation of the excitation light, harmonic signals are produced which may interfere with the detection of the signals on the fundamental frequencies f_1 and f_2 by the narrow-band amplifiers PSD1 and PSD2. It is possible to reduce these disturbances by selecting the ratio of the pitches of the two tracks (23 and 29) of the chopping wheel, and thus the ratio of the frequencies f_1 and f_2 , as an odd number. In this way, harmonics, for instance, of the

TRANSLATION

-10-

frequency f_1 are prevented from influencing the detection on the frequency f_2 . If one furthermore modulates the intensity of the excitation light at least approximately sinusoidally, harmonics are suppressed from the very start. A sinusoidal modulation is obtained by suitable adaptation of the cross section of the beam of the illuminating ray path in the plane of the chopping wheel to the dimensions of the openings in the chopping wheel.

For this purpose, the illuminating unit of the embodiment shown in Fig. 2 contains two collectors (33 and 34) of different focal length each of which so focuses the light of the lamp (32) in the plane of the chopping wheel (29) that two circular fields of different diameter corresponding to the size of the openings are produced on the two tracks of the chopping wheel. The two lenses (35 and 36) behind the chopping wheel (29), as seen in the direction of the light, serve to again adapt the two different individual ray paths in the illumination unit to each other. The other parts correspond to those in the embodiment of Fig. 1, so that repetition can be dispensed with here.

Fig. 3 shows an alternative embodiment of the illuminating unit of Figs. 1 and 2. The illuminating unit (104) in Fig. 3 contains within its housing (124) a modulation unit (105) formed of two individually controllable electro-optical light shutters (119 and 120) instead of the chopping wheel driven by a motor. The light shutters

TRANSLATION

-11-

modulate, independently of each other, the two individual beams passing through the filters (117 and 118). In order to be able to obtain the highest possible modulation frequency, Kerr cells, for instance, can be used for the light shutters.

This solution with two light shutters affords the advantage that the opening times or modulation frequencies can be freely selected and adjusted independently of each other, for both illumination ray paths. They can then be optimized with respect to the signal/noise ratio in the detection channel.

TRANSLATION

-12-

Abstract of the Disclosure

Microscope Photometer (Fig. 6)

Instead of the light (lamp housing), the photometer has an illumination unit (4) which can be attached to the microscope and which contains two replaceable filters and a chopper (5) which modulates simultaneously but with different frequencies the two individual beams passing through the filters. Two narrow-band amplifiers PSD1 and PSD2 which are tuned to the two frequencies of the chopper (5) are arranged, connected in parallel, in the detection channel.

TRANSLATION

-13-

Legends of Fig. 5:

y-axis fluorescence

x-axis excitation